

DOI: 10.26820/reciamuc/6.(2).mayo.2022.375-387

URL: <https://reciamuc.com/index.php/RECIAMUC/article/view/853>

EDITORIAL: Saberes del Conocimiento

REVISTA: RECIAMUC

ISSN: 2588-0748

TIPO DE INVESTIGACIÓN: Artículo de Investigación

CÓDIGO UNESCO: 3106 Ciencia Forestal

PAGINAS: 375-387



Caracterización molecular y morfológica del género *Pythium* provenientes de especies forestales

Molecular and morphological characterization of the genus *Pythium* from forest species

Caracterização molecular e morfológica do género *Pythium* a partir de espécies florestais

**María Esmeralda Cuzco Cruz¹; Jenny Patricia Quiñonez Bustos²;
Washington Guillermo Meza Cabrera³; Aldo José Loqui Sánchez⁴**

RECIBIDO: 20/02/2022 **ACEPTADO:** 10/04/2022 **PUBLICADO:** 30/05/2022

1. Cursando PhD (Doctorado en Agricultura Protegida); Master Universitario en Sanidad y Producción Vegetal; Docente Facultad de Ciencias Agrarias; Universidad de Guayaquil; Guayaquil, Ecuador; maria.cuzcoc@ug.edu.ec;  <https://orcid.org/0000-0003-2231-7626>
2. Cursando PhD (Doctorado en Educación); Magister en Agroecología y Agricultura Sostenible; Docente Facultad de Ciencias Agrarias; Universidad de Guayaquil; Guayaquil, Ecuador; jenny.quinonezb@ug.edu.ec;  <https://orcid.org/0000-0001-9196-1306>
3. Magister en Docencia Universitaria e Investigación Educativa; Docente Facultad de Ciencias Agrarias; Universidad de Guayaquil; Guayaquil, Ecuador; Washington.mezac@ug.edu.ec;  <https://orcid.org/0000-0002-7252-305X>
4. Cursando PhD (Doctorado en Educación); Magister en Riego y Drenaje; Docente Facultad de Ciencias Agrarias; Universidad de Guayaquil; Guayaquil, Ecuador; aldoloquis@ug.edu.ec;  <https://orcid.org/0000-0001-8953-5105>

CORRESPONDENCIA

María Esmeralda Cuzco Cruz
maria.cuzcoc@ug.edu.ec

Guayaquil, Ecuador

RESUMEN

El género *Pythium* es diverso en cuanto a especies, y el estudio acerca del comportamiento y morfología son muy escasos. Las estructuras de reproducción sexual y asexual, son una característica que permite la identificación a nivel de especie y el desconocimiento de las mismas dificulta la identificación de este género y por ende, el estudio de la interacción de las especies con sus hospederos ha sido limitada. El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Patología Vegetal de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universitat Politècnica de Valencia, basado en identificar las secuencias de la región ITS (Internal Spacer) del ADN ribosomal y la subunidad II de la citocromo c oxidasa (COX II) del ADN mitocondrial de 42 aislados procedentes de diversas especies forestales. Estas secuencias se amplificaron mediante la técnica PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) usando parejas de cebadores universales ITS 4 e ITS 6 y cebadores específicos FM 58 y FM 66 correspondientes a la región COX II, dando como resultado, la identificación de 13 especies pertenecientes al género *Pythium*, asociadas a plantas leñosas. En cuanto a la caracterización morfológica, se indujo a la formación de estructuras de reproducción sexual y/o asexual de cada especie, para la visualización mediante microscopio electrónico y conocer la morfología de cada una. Finalmente se determinó la tasa de crecimiento de las especies de *Pythium* spp. sometiénolas a diferentes temperaturas con aislados cultivados en medio V8, con la finalidad de conocer las temperaturas cardinales de cada especie.

Palabras clave: Caracterización Molecular, PCR, *Pythium*, Temperaturas Cardinales, Morfología.

ABSTRACT

The genus *Pythium* is diverse in terms of species, and the study on behavior and morphology are very scarce. Sexual and asexual reproduction structures are a characteristic that allows identification at the species level and the unknownness of them makes it difficult to identify this genus and therefore, the study of the interaction of species with their hostesses has been limited. This research work was carried out in the Laboratory of Plant Pathology of the Higher Technical School of Agronomic and Natural Environment Engineering of the Polytechnic University of Valencia, based on identifying the sequences of the ITS region (Internal Spacer) of ribosomal DNA and subunit II of cytochrome c oxidase (COX II) of mitochondrial DNA of 42 isolates from various forest species. These sequences were amplified by the PCR (Polymerase Chain Reaction) technique using pairs of its 4 and ITS 6 universal barleys and specific FM 58 and FM 66 feeders corresponding to the COX II region, resulting in the identification of 13 species belonging to the genus *Pythium*, associated with woody plants. As for the morphological characterization, it was induced to form sexual and/or asexual reproduction structures of each species, for visualization by electronic microscope and to know the morphology of each. The growth rate of *Pythium* spp species was finally determined. subjecting them to different temperatures with isolates grown in V8 medium, in order to know the cardinal temperatures of each species.

Keywords: Molecular Characterization, PCR, *Pythium*, Cardinal Temperatures, Morphology.

RESUMO

O género *Pythium* é diversificado em termos de espécies, e o estudo do comportamento e morfologia são muito escassos. As estruturas de reprodução sexual e assexuada são uma característica que permite a identificação a nível das espécies e o desconhecimento das mesmas torna difícil a identificação deste género e, portanto, o estudo da interacção das espécies com as suas hospedeiras tem sido limitado. Este trabalho de investigação foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da Escola Técnica Superior de Engenharia Agronómica e do Ambiente Natural da Universidade Politécnica de Valência, com base na identificação das sequências da região ITS (Espaçador Interno) de ADN ribossómico e subunidade II de citocromo c oxidase (COX II) de ADN mitocondrial de 42 isolados de várias espécies florestais. Estas sequências foram amplificadas pela técnica PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando pares das suas 4 e ITS 6 cevadas universais e alimentadores específicos FM 58 e FM 66 correspondentes à região COX II, resultando na identificação de 13 espécies pertencentes ao género *Pythium*, associadas a plantas lenhosas. Quanto à caracterização morfológica, foi induzido a formar estruturas de reprodução sexual e/ou assexual de cada espécie, para visualização por microscópio electrónico e para conhecer a morfologia de cada uma. A taxa de crescimento das espécies de *Pythium* spp foi finalmente determinada. sujeitando-as a diferentes temperaturas com isolados cultivados em meio V8, a fim de conhecer as temperaturas cardinais de cada espécie.

Palavras-chave: Caracterização Molecular, PCR, *Pythium*, Temperaturas Cardinais, Morfologia.

Introducción

El género *Pythium* consta de más de 140 especies, de las cuales, 41 de estas han sido descritas desde el año 2000, atribuyéndose a este género, la enfermedad conocida como pudrición de semillas y el marchitamiento de las plántulas (Kageyama, 2014)

En general, el rango de hospederos de *Pythium* suele ser amplio, aunque no esté determinado para muchas especies de este género (Aleix, 2015). Están estrechamente relacionados con las algas pardas y las diatomeas, pero su crecimiento filamentosos se asemeja al de los hongos verdaderos. Muchos miembros tienen estilos de vida saprofitos, pero algunos son patógenos vegetales muy importantes. Las especies de los géneros *Phytophthora*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Globisporangium*, a menudo denominados mohos de agua, se encuentran entre los miembros más importantes de Oomycetes debido a su patogenicidad e impacto económico en una gran cantidad de cultivos (de Cock, et al., 2015; Hendrix & Campbell, 1973; De Cock & Lévesque, 2004; Martin & Loper, 1999; Robideau, et al., 2011; Schroeder, et al., 2013; Uzuhashi, et al., 2010).

Los talos de los géneros *Pythium* están formados por hifas cenocíticas, de crecimiento apical. Se reproducen a través de mecanismos de tipo asexual y sexual. Los diferentes tipos de estructuras vegetativas y reproductivas permiten la identificación de las especies. El lugar de formación de estas zoosporas y su modo de liberación son las principales características diferenciales entre los géneros *Pythium* y *Phytophthora* (Frezzi, 1950; Erwin & Ribeiro, 1998)

Muchas especies de *Pythium* viven en el suelo y no todas son patógenas de plantas; algunas son estrictamente saprofitas, otras son micoparásitas, mientras que otras parasitan insectos u otros animales (Plaats – Niterink, 1981; Martin, 1992). En el caso de las enfermedades de las plantas, se han encontrado *Pythium* spp. causando ma-

yoritariamente daños en las raíces y tallos poco lignificados de plantas jóvenes, como el mal del almácigo (damping off) por afectar al embrión, hipocótilo y radícula, tanto en cultivos comerciales a cielo abierto como en cultivos de invernadero. Por ejemplo: *Pythium* sp. se ha reportado en frijol, geranio, crisantemos, begonias, poinsettias, *Pythium violae* en zanahoria, *P. sylvaticum* y *P. ultimum* en manzana, *P. aphanidermatum*, *P. spinosum*, *P. splendens*, *P. oligandrum* en pepino bajo condiciones de invernadero, *P. arrhenomanes* se ha citado que causa severos daños en caña de azúcar y *P. myriotylum* en tiquizque, entre otros (Pacumbaba, et al., 1992; Tambog, et al., 1999; Mazzola, et al., 2007; Moornman, et al., 2007; Al-Sa'di, et al., 2006).

Según Aleix (2015), especies como *P. spiculum* y *P. sterilum*, son patógenos agresivos de raíces de *Q. ilex* y *Q. suber*, provocando una marchitez extendida en la parte aérea del vegetal. Otras patologías asociadas a estos patógenos son: defoliación, muerte regresiva de ramas y ápice del árbol, siendo un riesgo potencial para los bosques de *Quercus* en el centro de España (Romero, et al., 2007). En España, los alcornoques naturales y bajo cultivo se ven gravemente afectador por el declive provocado por la pudrición de las raíces producidas por *Pythium spiculum* (González, et al., 2020).

La necesidad de la identificación de las especies del género *Pythium* radica, en que generalmente se asocia a este patógeno como el causante del damping – off sobre todo de plantas con raíces poco lignificadas y pudrición de semillas, cuando en investigaciones recientes han concluido que también son causantes de daños en plantas con raíces lignificadas, provocando síntomas tales como decaimiento temporal y muerte lenta en árboles; la interacción planta-patógeno-ambiente varía según la especie y su patogenicidad, siendo importante conocer más a fondo las distintas especies para poder realizar controles más eficaces

contra estos patógenos, además de actualizar la información concerniente a este género y aportar con nuevos datos que contribuyan al conocimiento científico.

Materiales y métodos

Se utilizaron aislados procedentes de una colección obtenida de diversas especies leñosas (**Tabla 1.**), conservados en frascos con agua estéril a temperaturas de 15 °C. Se procedió a repicar cada uno de los aislados en medio de cultivo CMA-PARPB (17 g de CMA (harina de maíz-agar), 0,4 g de pimaricina, 0,125 g de ampicilina, 0,01 g de rifampicina, 0,02 g de benomilo, 0,101 g de penta-cloro-nitrobenceno y 1 litro de agua destilada), y estas colonias obtenidas fueron repicadas en medio PDA (papa dextrosa agar) para obtener cultivos puros y poder realizar los ensayos de identificación molecular y conocer las temperaturas cardinales de cada especie. Finalmente, cada aislado fue repicado en medio V8 y sometido a temperaturas variables en incubadoras de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 °C utilizando dos repeticiones con tres unidades experimentales para la obtención de datos.

Tabla 1. Procedencia y hospederos de aislados de *Pythium*.

Código aislado	Procedencia	Hospedero
Py – 213	Jardín	<i>Celtis</i> sp.
Py – 273	Cáceres	<i>Quercus ilex</i>
Py – 275	Jardín	<i>Fraxinus</i> sp.
Py – 277	Dehesa	<i>Quercus ilex</i>
Py – 281	Dehesa	<i>Quercus ilex</i>
Py – 283	Dehesa	<i>Quercus ilex</i>
Py – 291	Dehesa	<i>Quercus ilex</i>
Py – 294	Dehesa	<i>Quercus ilex</i>
Py – 310	Dehesa	<i>Quercus ilex</i>
Py – 311	Dehesa	<i>Quercus ilex</i>
Py – 326	Dehesa	<i>Quercus ilex</i>
Py – 328	Dehesa	<i>Quercus ilex</i>
Py – 331	Dehesa	<i>Quercus ilex</i>
Py – 332	Dehesa	<i>Quercus ilex</i>
Py – 334	Dehesa	<i>Quercus ilex</i>
Py – 335	Dehesa	<i>Quercus ilex</i>
Py – 338	Monte	<i>Quercus ilex</i>
Py – 340	Monte	<i>Quercus ilex</i>
Py – 350	Monte	<i>Quercus ilex</i>
Py – 354	Monte	<i>Quercus ilex</i>
Py – 359	Monte	<i>Quercus ilex</i>
Py - 360	Monte	<i>Quercus ilex</i>
Py – 362	Monte	<i>Quercus ilex</i>

Py – 367	Carrascar Font	<i>Quercus ilex</i>
	Roja	
Py – 395	Monte	<i>Quercus ilex</i>
Py - 401	Monte	<i>Quercus ilex</i>
Py – 407	Monte	<i>Quercus ilex</i>
Py – 410	Monte	<i>Quercus ilex</i>
Py – 412	Monte	<i>Quercus ilex</i>
Py – 413	Monte	<i>Quercus ilex</i>
Py – 434	Monte	<i>Quercus ilex</i>
Py – 450	Jardín	<i>Magnolia grandiflora</i>
		<i>Magnolia grandiflora</i>
Py - 451	Jardín	<i>Fraxinus</i> sp.
Py – 488	Jardín	<i>Quercus ilex</i>
Py – 515	Monte	<i>Quercus ilex</i>
Py – 571	Monte	<i>Quercus ilex</i>
Py – 588	Monte	<i>Quercus ilex</i>
Py – 608	Monte	<i>Quercus ilex</i>
Py – 635	Jardín	<i>Quercus</i> sp.
Py – 639	Jardín	<i>Casuarina</i> sp.
Py – 642	Jardín	<i>Casuarina</i> sp.
Py - 660	Jardín	<i>Taxus baccata</i>

La identificación molecular se basó en el análisis de las secuencias de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN ribosomal con los cebadores universales ITS 4 e ITS 6 y de la región COX II (gen de la citocromo oxidasa II) del ADN mitocondrial con los cebadores FM 58 y FM 66, realizando extracciones rápidas del ADN a partir de una pequeña cantidad de micelio, para su uso en reacciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y ser sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

En cuanto a la caracterización morfológica de los aislados fue necesaria la inducción de estructuras de reproducción, para ello, se utilizaron discos de V8 que contenían el micelio de este oomiceto e incubarlo en condiciones estériles en cajas Petri, que contenían agua estéril y hojas de *Lolium perenne*. Estas hojas fueron previamente esterilizadas con el objetivo de descartar agentes patógenos que contaminen el ensayo. Las placas se mantuvieron por cinco días a temperatura ambiente para permitir que el oomiceto colonice las hojas y poder preparar las muestras tomando una pequeña parte del micelio y visualizar en el microscopio. En otros casos, fue necesario incubar a 10 °C durante 24 horas para la inducción de estructuras de reproducción.

Para el estudio correspondiente a la tasa de crecimiento de los diferentes aislados de *Pythium*, se obtuvieron datos procedentes de dos repeticiones con tres unidades experimentales cada una, realizando la primera evaluación a las 24 horas, debido a que este oomiceto se caracteriza por un rápido crecimiento micelial y se midió diariamente el diámetro de la colonia durante siete días.

Resultados

Caracterización molecular

La identificación molecular de los 42 aislados de *Pythium* incluidos en el presente trabajo se ha basado en las secuencias de la región ITS del ADN ribosómico y de la región COX II (gen de la citocromo C oxidasa II) del ADN mitocondrial. Para ello se realizó una extracción rápida de ADN de colonias crecidas en medio PDA, e inmediatamente se preparó la mezcla de reactivos necesaria para la amplificación de la región ITS con

los cebadores universales ITS 4 e ITS 6 y la amplificación de la región COX II con los cebadores FM 58 y FM 66. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1 % para comprobar que efectivamente se había producido la amplificación, antes del envío de las muestras a Macrogen Inc. para su secuenciación y, además, estimar el tamaño de las amplificaciones mediante comparación con el marcador “escalera” de 100pb dispuesto en los pocillos de los extremos.

El tamaño de las amplificaciones ITS se estimó entre 900 y 1100 pb, variando según el aislado de *Pythium*, y el tamaño de los amplificados COX II fue más homogéneo en todos los aislados de *Pythium* analizados, siendo de 600-650 pb. El resultado de la comparación de las secuencias ITS y COX II de los aislados de *Pythium* con la información contenida en la base de datos GenBank permitió la identificación a nivel de 13 especies de *Pythium*.



Figura 1. Amplificación de la región ITS de aislados de *Pythium* con los cebadores ITS 4 e ITS 6.

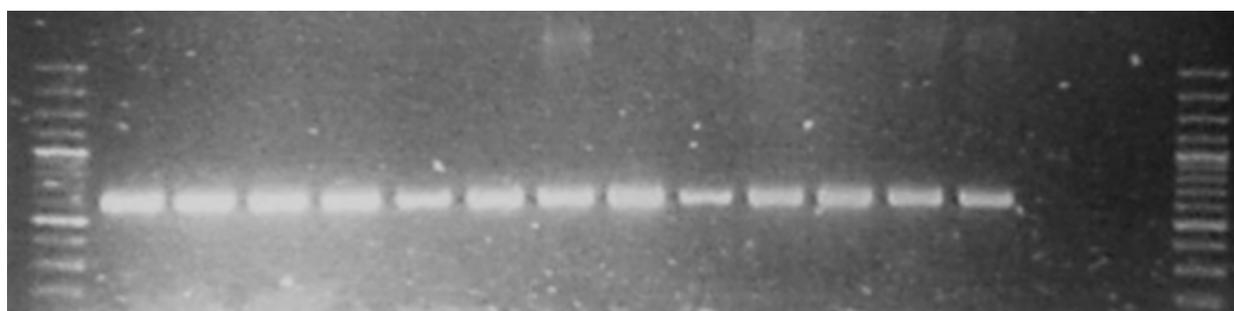


Figura 2. Amplificación de la región COX II de aislados de *Pythium* con la pareja de cebadores FM 58 y FM 66.

Tabla 2. Especies identificadas con la región COX II (Cytochrome C Oxidase Subunit II).

Nº de muestra	Especie
Py - 213	<i>Pythium vexans</i>
Py - 273	<i>Pythium ornamentatum</i>
Py - 275	<i>Pythium heterothallicum</i>
Py - 277	<i>Pythium irregulare</i>
Py - 281	<i>Pythium spiculum/Pythium mamillatum</i>
Py - 283	<i>Pythium spiculum/Pythium mamillatum</i>
Py - 291	<i>Pythium spiculum/Pythium mamillatum</i>
Py - 294	<i>Pythium mamillatum</i>
Py - 310	<i>Phytophthora sp.</i>
Py - 311	<i>Pythium spiculum/mamillatum</i>
Py - 326	<i>Pythium mamillatum</i>
Py - 328	<i>Pythium mamillatum</i>
Py - 331	<i>Pythium spiculum/Pythium mamillatum</i>
Py - 332	<i>Pythium spiculum/Pythium mamillatum</i>
Py - 334	<i>Pythium spiculum/Pythium mamillatum</i>
Py - 335	<i>Pythium spiculum/Pythium mamillatum</i>
Py - 338	<i>Pythium dissotocum/Pythium monospermum</i>
Py - 340	<i>Pythium dissotocum/Pythium monospermum</i>
Py - 350	<i>Phytophthora sp.</i>
Py - 354	<i>Pythium heterothallicum</i>
Py - 359	<i>Pythium conidiophorum</i>
Py - 360	<i>Pythium heterothallicum</i>
Py - 362	<i>Pythium spinosum/Pythium intermedium</i>
Py - 367	<i>Pythium heterothallicum</i>
Py - 395	<i>Pythium heterothallicum</i>
Py - 401	<i>Pythium kandovanense</i>
Py - 407	<i>Pythium heterothallicum</i>
Py - 410	<i>Pythium acanthicum/Pythium hydnosporum</i>
Py - 412	<i>Pythium cederbergense</i>
Py - 413	<i>Pythium kandovanense</i>
Py - 434	<i>Pythium rostratiformis</i>
Py - 450	<i>Pythium intermedium</i>
Py - 451	<i>Pythium intermedium</i>
Py - 488	<i>Pythium heterothallicum</i>
Py - 515	<i>Pythium conidiophorum</i>
Py - 571	<i>Pythium cederbergense</i>
Py - 588	<i>Pythium heterothallicum</i>
Py - 608	<i>Pythium heterothallicum</i>
Py - 635	<i>Pythium vexans</i>
Py - 639	<i>Pythium vexans</i>
Py - 642	<i>Pythium vexans</i>
Py - 660	<i>Pythium vexans</i>

Caracterización morfológica

En cuanto a la caracterización morfológica, se escogieron muestras que sirvieron de representantes de cada especie identificada molecularmente. La descripción morfológica de cada una de las especies identificadas se describe a continuación:

Pythium acanthicum

Posee oogonios globosos, intercalares y terminales, con ornamentaciones de proyecciones puntiagudas y delgadas. Las oosporas son pleróticas.

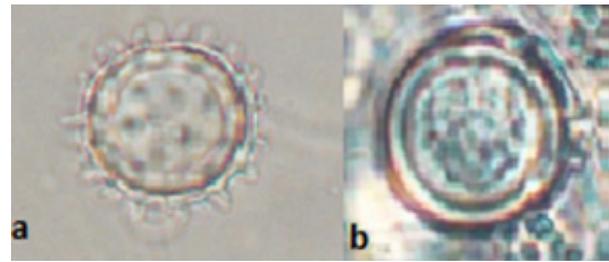


Figura 3. Caracterización de las estructuras sexuales: a) oogonio ornamentado y b) oospora.

Pythium cederbergense

Presenta oogonios globosos, de paredes lisas, terminales con diámetros de 16 µm. Las oosporas son pleróticas y el anteridio puede ser diclino o monoclino.

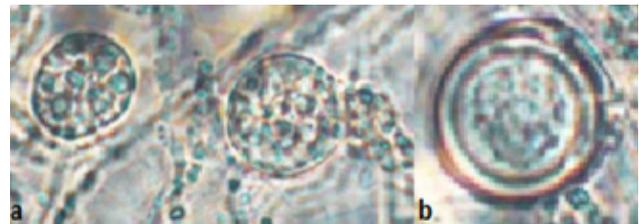


Figura 4. Caracterización de las estructuras sexuales a) oogonio y anteridio y b) oospora plerótica.

Pythium conidiophorum

El oogonio es globoso, terminal e intercalar conectados por las hifas. Los esporangios pueden ser terminales e intercalares, globosos, terminando en puntas que dan origen a nuevas hifas.

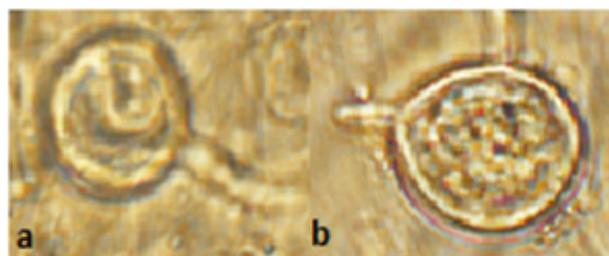


Figura 5. Caracterización de las estructuras sexuales: a) oogonio y estructuras asexuales: b) esporangio.

Pythium dissotocum

El oogonio puede ser lateral o intercalar, subgloboso y los esporangios son filamentosos, sin engrosamientos, presentando ramificaciones en muchos casos.



Figura 6. Caracterización de las estructuras sexuales: Oogonios.

Pythium heterothallicum

El oogonio es globoso, terminal o intercalar. Las oosporas son apleróticas.

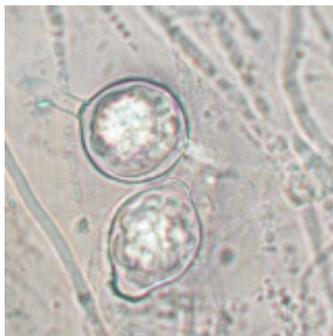


Figura 7. Caracterización de las estructuras sexuales: Oogonios.

Pythium intermedium

Debido a que esta especie es heterotálica, el anteridio y oogonio se forman en cultivos pareados de aislados compatibles. En este caso, se presenciaron esporangios esféricos, en ocasiones intercalares, formando cadenas hacia el extremo de las hifas. Las oosporas pueden ser pleróticas y apleróticas.

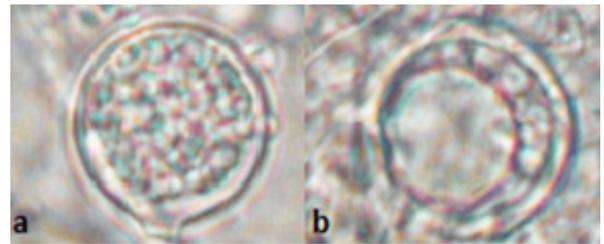


Figura 8. Caracterización de las estructuras sexuales: a) esporangios y estructuras sexuales: b) oospora plerótica.

Pythium irregulare

El oogonio es globoso a irregular, terminal, intercalar, con proyecciones cónicas variables y con gran variedad de tamaños. Las oosporas pueden ser pleróticas o apleróticas.

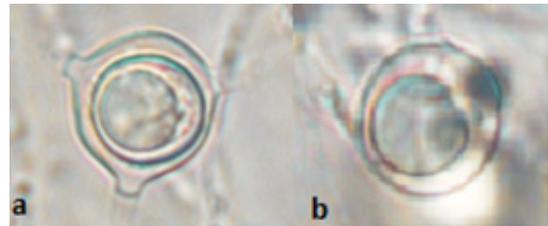


Figura 9. Caracterización de las estructuras sexuales: a) oogonio y b) oospora aplerótica.

Pythium kandovanense

Con esta especie, fue necesario incubar las preparaciones a temperaturas bajas (10 °C) para poder inducir la formación de estructuras de reproducción, ya que, a temperatura ambiente, sólo se presentaban producción de hifas. El oogonio es liso, globoso, terminal o intercalar. Los esporangios son intercalares, terminales, esféricos u ovoides. Las oosporas son pleróticas.

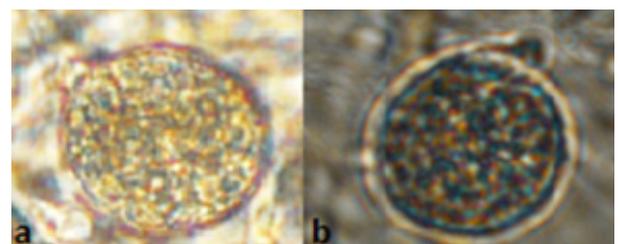


Figura 10. Caracterización de las estructuras asexuales y sexuales: a) esporangio y b) oogonio.

Pythium mamillatum

Oogonio oblongo, intercalar o terminal con ornamentaciones ligera o curvas bastantes irregulares. Las oosporas son globosas y pleróticas.

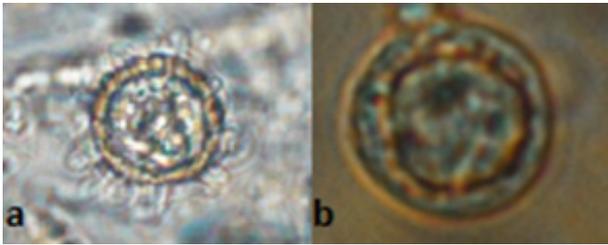


Figura 11. Caracterización de las estructuras sexuales a) Oogonio ornamentado y b) oospora.

Pythium ornamentatum

Oogonio esférico con proyecciones puntia-gudas y continuas. Oosporas globosas y pleróticas.



Figura 12. Caracterización de las estructuras sexuales: Oogonio ornamentado.

Pythium rostratifingens

Oogonio liso, esférico, intercalar. Oosporas pleróticas.

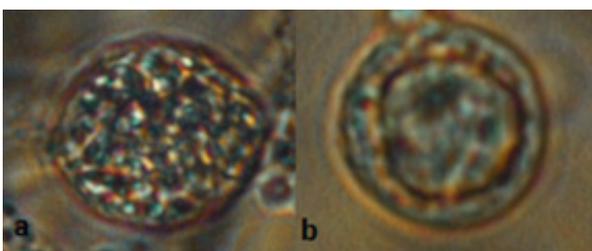


Figura 13. Caracterización de las estructuras sexuales: a) Oogonio y b) oospora.

Pythium spiculum

Oogonio terminal, provisto de ornamentaciones. Oosporas esféricas, con paredes delgadas, y mayoritariamente pleróticas.

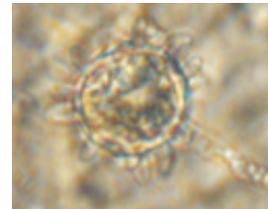


Figura 14. Caracterización de las estructuras sexuales: Oogonio ornamentado.

Pythium vexans

Oogonios globosos. Los esporangios pueden ser globosos, ovoides, aperados, intercales o terminales. Las oosporas son apleróticas, dejando espacios en la cavidad oogonial.

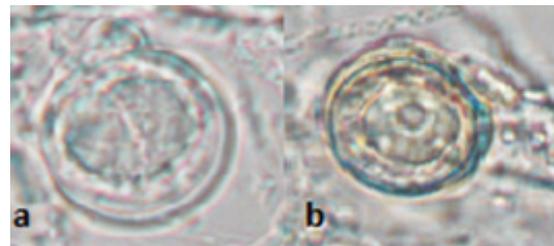


Figura 15. Caracterización de las estructuras sexuales y asexuales: a) oogonio y b) esporangio.

Tasa de crecimiento

En cuanto a temperaturas mínimas y máximas de crecimiento, todas las especies presentan un crecimiento lento pero constante a los 5 °C y 10 °C, situando el rango óptimo de crecimiento entre 20 °C a 30 °C, algunas especies presentaron crecimiento a los 35 °C, mientras que los 40 °C resultó letal para todas las especies estudiadas (Tabla 2).

Tabla 3. Temperaturas máximas y mínimas de crecimiento del género *Pythium*.

Especie	Temperatura mínima	Temperatura óptima	Temperatura máxima
<i>Pythium acanthicum</i>	5 °C	25 – 35 °C	35 °C
<i>Pythium cederbergense</i>	5 °C	25 – 30 °C	30 °C
<i>Pythium conidiophorum</i>	5 °C	15 – 20 °C	25 °C
<i>Pythium dissotocum</i>	5 °C	25 – 30 °C	35 °C
<i>Pythium heterothallicum</i>	5 °C	25 – 30 °C	30 °C
<i>Pythium intermedium</i>	5 °C	20 – 30 °C	30 °C
<i>Pythium irregulare</i>	5 °C	20 – 30 °C	35 °C
<i>Pythium kandovanense</i>	5 °C	20 – 25 °C	30 °C
<i>Pythium mamillatum</i>	5 °C	15 – 25 °C	30 °C
<i>Pythium spiculum</i>	5 °C	25 – 30 °C	35 °C
<i>Pythium ornamentatum</i>	5 °C	20 – 35 °C	35 °C
<i>Pythium rostratifingens</i>	5 °C	20 – 25 °C	30 °C
<i>Pythium vexans</i>	5 °C	25 – 30 °C	35 °C

Discusión

Caracterización molecular

Según los resultados obtenidos en la identificación molecular, las secuencias de la región ITS no fueron concluyentes en muchos aislados, dando como resultado dos o más especies e incluso géneros distintos. La amplificación de la región COX II permitió resolver los casos de identificación donde la región ITS no fue resolutoria, concluyendo con la identificación de 13 especies del género *Pythium*. Esto concuerda con lo manifestado por (Martin, 2000), el análisis de secuencias del gen COX II, corroboran los hallazgos obtenidos por las secuencias ITS, además de aclarar las relaciones filogenéticas entre especies.

Asimismo, pese a que se obtuvo la secuencia de la región COX II de los diferentes aislados, este paso no fue resolutorio en algunas muestras, teniendo que recurrir a diferentes trabajos bibliográficos acerca de la morfología del género *Pythium*, para po-

der llegar a nivel de especie. Este resultado evidencia, que la caracterización molecular pese a ser una herramienta rápida, no debe ser considerada como la única opción para identificar especies, esto concuerda con lo expresado por (Paulitz & Mazzola, 2003), sobre los estudios moleculares, que si bien constituyen una herramienta rápida y eficaz no deben ser considerados como una metodología de reemplazo de la identificación sobre la base de estudios morfológicos, biométricos y culturales. Estas metodologías deben considerarse complementarias para la identificación taxonómica de los Oomycetes.

Caracterización morfológica

La identificación a nivel de especie de *Pythium* es fundamental para poder realizar un manejo en el control de enfermedades asociadas a este patógeno. En cuanto a las características morfológicas de las diferentes especies, su observación mediante microscopio electrónico de las estructuras de reproducción, permite identificar aque-

llos casos donde la identificación molecular no es concluyente, al momento la monografía publicada por (Van Der Plaats-Niterink, 1981) es el trabajo más completo del género *Pythium*.

Una característica importante de la mayoría de especies de *Pythium* es su capacidad de ejercer como parásito facultativo (Martin, 1992). Deacon (1979) citado por Van Der Plaats-Niterink (1981), demostró que *P. intermedium* y *P. irregulare* son capaces de producir celulasas y esta última especie, además produce fitotoxinas y factores de crecimiento. Este tipo de resultados, una vez más evidencia la importancia del estudio de cada una de las especies pertenecientes a este género y no generalizar su comportamiento.

Tasa de crecimiento

Por último, la tasa de crecimiento a diferentes temperaturas de la mayoría de especies estudiadas, presentaron valores máximos de crecimiento con temperaturas de 20 °C a 30 °C. Concordando con el patrón de crecimiento que refieren (Rey, et al., 1998) quienes manifiestan que las mejores condiciones para el desarrollo de este género fluctúan entre 20 °C y 30 °C. Hernández & Plasencia (2013), afirman que el daño causado por el género *Pythium*, puede ocurrir durante los períodos de tiempo fresco (13 – 18 °C) y húmedo, aumentando su agresividad con temperaturas cálidas (30 – 35 °C) con condiciones de alta humedad o lluvia. Estos datos, nos permiten considerar qué especie puede encontrarse en el cultivo, y a su vez conocer el comportamiento de las especies con su entorno.

La temperatura tiene tanto efecto en el desarrollo de la enfermedad como la humedad del suelo. Las especies de *Pythium* que no producen zoosporas fácilmente responden más a la temperatura que a la humedad del suelo o sustrato y viceversa (Hendrix & Campbell, 1973). Las distintas especies del patógeno tienen diferentes exigencias en cuanto a temperatura. Algunas especies in-

fectan más y mejor a temperaturas bajas y otras a temperaturas más altas.

En la revisión del género *Pythium* realizado en Nueva Zelanda por (Robertson, 1980) menciona que, *Pythium acanthicum* crece a una temperatura mínima de 5 °C, las temperaturas óptimas oscilan a 25 °C, mientras que las máximas se sitúan a 40 °C. En esta investigación, los datos de las temperaturas mínimas y óptimas coinciden, pero en cuanto a temperaturas máximas, se ubican a 35 °C, puesto que, a esta temperatura, esta especie ralentizó su crecimiento, y al someterla a una temperatura de 25 °C, se pudo comprobar que los 35 °C habían resultado letales para esta especie.

En lo que respecta a *P. conidiophorum* presentó una temperatura mínima de 5 °C, óptimas entre 15 -20 °C y una máxima de 25 °C. Estos datos coinciden de manera parcial con el trabajo realizado por (Ali, 1986) , quien índice que presenta na temperatura mínima entre 0 – 5 °C y óptimas de 20 °C, pero respecto a las temperaturas máximas, difieren totalmente, ya que este autor indica entre 30 – 35 °C como máximas de crecimiento.

En un estudio realizado por (Rodríguez, et al., 1999), afirman que el desarrollo de *P. irregulare* es máximo a temperaturas comprendidas entre 25 y 30°C y lo 35°C se sitúa como temperatura máxima de crecimiento. La temperatura mínima es de 7°C con un crecimiento muy ralentizado. Este rango de temperaturas coincide con los resultados de esta investigación, que sitúa los 5°C como temperatura mínima de crecimiento, 20 – 30°C óptimas, y un máximo de crecimiento a 35°C. Especies como *P. irregulare* provoca mayor mortalidad en plantas ornamentales a 15,5°C frente a la escasa mortalidad causada a 23 °C (Keim, et al., 1978).

En el estudio realizado por (Da Silva & Pires, 2009), sobre el efecto de las temperaturas sobre *P. dissotocum*, mostraron una temperatura óptima a 28 °C, hallándose una mayor tasa de crecimiento a los 30 °C, la máxima

a 34 °C, resultados que no muy diferentes a los estudiados en esta investigación. En cuanto a la temperatura mínima, los resultados obtenidos difieren con las autoras, siendo este de 15 °C y en esta investigación, el oomiceto presentó crecimiento micelial ralentizado desde los 5 °C.

(Van Der Plaats-Niterink, 1981) sitúa la temperatura óptima de *P. intermedium* entre 20 y 25°C, y la mínima es de 5°C y máximas de 30°C. Este resultado es parecido al obtenido en este trabajo, que obtuvo como resultados valores de 5°C como mínimo, 20 – 25°C óptimo y con un máximo de crecimiento a 30°C, a partir de este rango el crecimiento del oomiceto disminuye paulatinamente.

En el caso de *P. heterothallicum* este presenta un mayor crecimiento a 25 °C, mientras que a 15°C su crecimiento se ve ralentizado (Navarro, et al., 2021). Respecto a ambas temperaturas, coincide con las óptimas halladas en este estudio, que se sitúan entre 25 -30 °C.

P. kandovanense presentó crecimiento desde los 5 °C, con temperaturas óptimas entre los 20 -25 °C, creciendo de manera ralentizada hasta los 30 °C, lo que concuerda con (Chenary, et al., 2015) quienes manifiestan que este oomiceto es capaz de producir zoosporas solo entre 0 y 5 °C, produciéndose un crecimiento óptimo entre los 22 °C y una máxima a 28 °C.

(Ali, 1986) describe para *P. mamillatum*, temperaturas mínimas, óptimas y máximas de, 5 °C, 25°C y 37 °C respectivamente, mientras que en el presente estudio se sitúan en 5, 15 -25 y 30 °C respectivamente.

De Cock & Lévesque (2004) ubican el crecimiento de *P. rostratifingens* por debajo de los 3 °C como temperatura mínima, óptimas de 27 °C y una temperatura máxima entre 33 – 36 °C, mientras que en esta investigación coinciden en las temperaturas mínimas y óptimas, pero respecto a las temperaturas máximas, creció a 30 °C y a 35 °C esta temperatura resultó letal para esta especie.

En un estudio realizado por (Paul, et al., 2006), muestra que *P. spiculum* presenta un crecimiento exponencial a los 25 °C, valor que coincide con las temperaturas óptimas halladas en este estudio.

En el caso específico de *P. ornamentatum*, se establecen estudios más a fondo, ya que en un estudio realizado por (Karaca, et al., 2008), sugieren que *Pythium lycopersicum* y *P. ornamentatum* pueden tratarse de la misma especie.

En un estudio realizado por (Biesbrock & Hendrix, 1969) concluyeron que *P. vexans* crece rápidamente a una temperatura de 30 °C, mientras que de 5 a 35 °C el crecimiento de esta especie se vio severamente restringido, datos que difieren de lo hallado en esta investigación, que si bien muestra una temperatura óptima de crecimiento entre 25 – 30 °C, la temperatura mínima se localiza a 5 °C con un crecimiento muy ralentizado, y la temperatura máxima se dio a los 35 °C.

Conclusiones

La identificación molecular es importante en la búsqueda de mayor conocimiento de las especies de este género, siendo el primer paso la identificación a nivel de especie para conocer su patogenicidad y posibles métodos de control, ya que, el comportamiento de las especies de este género es variable y el desconocimiento del mismo ha provocado que el manejo de estos patógenos no sea totalmente efectivo. Las secuencias de la región COX II permitió la identificación a nivel de especie en los casos donde la ITS no fue concluyente.

La observación de las estructuras de reproducción, tanto sexual como asexual, permite llegar a la identificación de las especies en los casos donde la identificación molecular no es capaz de diferenciarlas.

La importancia de conocer las temperaturas mínimas y máximas, se las realizó con el objetivo de conocer el momento donde el patógeno es más susceptible y realizar

controles eficaces contra estos oomicetos. Esta información también es importante, porque nos permite tener una guía de las zonas geográficas donde puede hallarse el patógeno.

En el caso de *P. spiculum* y *P. cederbergense* se establecen temperaturas mínimas de 5, óptimas de 25 – 30 °C, y en el caso de las máximas crecimiento a 35 y 30 °C respectivamente.

Para el estudio de las características morfológicas de especies como *P. cederbergense* y *P. kandovanense* fue necesario incubarlas a 10 °C durante 24 horas para inducir las a formar estructuras de reproducción.

Cabe resaltar la necesidad de seguir realizando trabajos investigativos, realizando test de patogenicidad con las especies descritas y conocer su interacción con demás especies vegetales.

Bibliografía

- Aleix, R., 2015. Un caso de diagnóstico: encinas con síntomas de decaimiento procedentes de las localidades de Alcoi, Alcublas y Pina de Montalgrao. [Tesis de grado] (Universitat Politècnica de València).
- Ali, M., 1986. The Genus *Pythium*. In the West Bank and Gaza Strip. Nablus: Research and Documentation Centre.
- Al-Sa'di, a. y otros, 2006. Molecular characterization and pathogenicity of *Pythium* species associated with damping-off in greenhouse cucumber (*Cucumis sativus*) in Oman. *Plant Pathology*, 56(1), pp. 140-149.
- Biesbrock, J. & Hendrix, F., 1969. Influence of Soil Water and Temperature on Root Necrosis of Peach Cause by *Pythium* spp.. *Journal Series Paper*, 60(507), pp. 880-882.
- Chenary, A., Arzanlou, M., Tojo, M. & Babai, A., 2015. *Pythium kandovanense* sp. nov., a fungus-like eukaryotic micro-organism (Stramenopila, Pythiales) isolated from snow-covered ryegrass leaves. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 65(8), pp. 2500-2506.
- Da Silva, K. & Pires, C., 2009. Patogenicidade in vitro de *Pythium aphanidermatum* e *Pythium dissotocum* em variedades de alface (*Lactuca sativa* L.). *Hoehnea*, 36(1), pp. 161-172.
- De Cock, A. & Lévesque, A., 2004. New species of *Pythium* and *Phytophthora*. *Studies in Mycology*, 50(2), pp. 481-487.
- de Cock, A. y otros, 2015. *Phytophythum: Molecular phylogeny and systematics*. *Persoonia*, Volumen 34, pp. 25-39.
- Erwin, D. & Ribeiro, O., 1998. *Phytophthora Diseases Worldwide*. The American Phytopathological Society, 47(2), pp. 224-225.
- Frezzi, J., 1950. Las especies de *Phytophthora* en la Argentina. *Investigaciones Agrícolas*, Volumen 4, pp. 47 - 55.
- González, M., Romero, M., Serrano, M. & Sánchez, M., 2020. La inyección de fosetil-aluminio controla la pudrición de la raíz que afecta a *Quercus suber* en el sur de España. *Revista Europea de fitopatología*, Volumen 156, pp. 101-109.
- Hendrix, F. & Campbell, W., 1973. *Pythiums as Plant Pathogens*. *Annual Review of Phytopathology*, Volumen 11, pp. 77-98.
- Hernández, C. & Plasencia, J., 2013. Biocontrol del mal del semillero, enfermedad causada por los hongos *Pythium* sp. y *Phytophthora* sp. En tomate de árbol (*Solanum betaceum*) empleando hongos antagonistas del género *Trichoderma* sp a nivel de semillero. [Tesis] (Universidad Politécnica Salesiana).
- Kageyama, K., 2014. Taxonomía molecular y su aplicación a estudios ecológicos de especies de *Pythium*. *Revista de patología vegetal general*, Volumen 80, pp. 314-326.
- Karaca, G., Tepedelen, G., Belghouthi, A. & Paul, B., 2008. A new mycoparasite, *Pythium lycopersicum*, isolated in Isparta, Turkey: morphology, molecular characteristics, and its antagonism with phytopathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 288(2), pp. 163-170.
- Keim, R., Mock, T., Endo, R. & Krausman, M., 1978. Pathogenicity, characteristics and host range of the fungus *Pythium irregulare* Buis. in a container nursery in southern California. *HortScience*, 13(3), pp. 295-296.
- Martin, F., 1992. The genus *Pythium*. En: S. y. col, ed. *Methods for Research on Soil Borne Phytopathogenic Fungi*. Minnesota: American Phytopathological Society, p. 265.

- Martin, F., 2000. Phylogenetic Relationships among Some Pythium Species Inferred from Sequence Analysis of the Mitochondrially Encoded Cytochrome Oxidase II Gene. *Mycology*, 92(4), pp. 711-727.
- Martin, F. & Loper, J., 1999. Soilborne plant diseases caused by Pythium spp.: Ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(2), pp. 111-181.
- Mazzola, M., Andrews, P., Reganold, J. & Lévesque, A., 2007. Frequency, Virulence, and Metalaxyl Sensitivity of Pythium spp. Isolated from Apple Roots Under Conventional and Organic Production Systems. *Plant Disease*, 86(6), pp. 669-675.
- Moornman, G., Kang, S., M. G. & Kim, H., 2007. Identification and Characterization of Pythium Species Associated with Greenhouse Floral Crops in Pennsylvania. *Plant Disease*, 86(11), pp. 1227-1231.
- Navarro, K. y otros, 2021. The Effect of Incubation Temperature on the Species Composition of Phytophthora, Phytopythium, and Pythium Communities Associated with Soybean. *Phytobiomes Journal*, 5(2), pp. 133-144.
- Pacumbaba, R., Wutoh, J. & Mboka, M., 1992. Protocol to screen cocoyam accessions for resistance or tolerance to cocoyam root rot disease in Cameroon. *Plant Disease*, 76(8), pp. 768-770.
- Paul, B. y otros, 2006. A new species of Pythium with ornamented oogonia: morphology, taxonomy, internal transcribed spacer region of its ribosomal RNA, and its comparison with related species. *FEMS Microbiology Letters*, 250(2), pp. 317-323.
- Paulitz, T. & Mazzola, M., 2003. Pythium abappressorium a new species from east Washington. *Mycologia*, 95(1), pp. 80-86.
- Rey, P. y otros, 1998. Pythium F in soilless cultures: detection, colonization and incidence on tomato roots. *Bulletin OILB SROP*, 9(6), pp. 19-25.
- Robertson, G., 1980. The Genus Pythium in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, 18(1), pp. 73-102.
- Robideau, G. y otros, 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I an internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources*, Volumen 11, pp. 1002-1011.
- Rodríguez, E., Sinobas, A. & Varés, L., 1999. Influencia del tipo de «cebo» y la temperatura en el aislamiento y desarrollo de Pythium spp. *Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas*, 25(2), pp. 131-142.
- Romero, M. y otros, 2007. Nuevo Pythium Taxa causa pudrición de la raíz en especies mediterráneas de Quercus en el suroeste de España y Portugal. *Journal of Phytopathology*, 155(5), pp. 289-295.
- Schroeder, K. M. F. y otros, 2013. Molecular detection and quantification of Pythium species: Evolving taxonomy, new tools, and challenges. *Plant disease*, Volumen 97, pp. 4-20.
- Tambog, J., Poppe, J. & Höfte, M., 1999. Pathogenicity, Electrophoretic Characterisation and In planta Detection of the Cocoyam Root Rot Disease Pathogen, Pythium myriotylum. *European Journal of Plant Pathology*, Volumen 105, pp. 597-607.
- Uzuhashi, S., Tojo, M. & Kakishima, M., 2010. Phylogeny of the genus Pythium and description of new genera. *Mycoscience*, Volumen 51, pp. 337-365.
- Van Der Plaats-Niterink, J., 1981. Monograph of the genus Pythium. *Studies in Mycology*, Issue 21, p. 244.

CITAR ESTE ARTICULO:

Cuzco Cruz, M. E., Quiñonez Bustos, J. P., Meza Cabrera, W. G., & Loqui Sánchez, A. J. (2022). Caracterización molecular y morfológica del género Pythium provenientes de especies forestales. *RECIAMUC*, 6(2), 375-387. [https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.\(2\).mayo.2022.375-387](https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.(2).mayo.2022.375-387)

